

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> <b>A61K 49/00, 47/48, 51/10</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/18439</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 6. April 2000 (06.04.00)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP99/07198 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 29. September 1999 (29.09.99) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 45 798.7      29. September 1998 (29.09.98)      DE <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, D-13342 Berlin (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> KRAUSE, Werner [DE/DE]; Turmfalkenstrasse 39a, D-13505 Berlin (DE). MUSCHICK, Peter [DE/DE]; Biesenthaler Weg 3, D-16321 Ladeburg (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, ES, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
<b>(54) Title:</b> USE OF NEOANGIOGENESIS MARKERS FOR DIAGNOSING AND TREATING TUMOURS BY THERAPY <b>(54) Bezeichnung:</b> VERWENDUNG VON NEOANGIOGENESE-MARKERN FÜR DIAGNOSE UND THERAPIE VON TUMOREN <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to the use of conjugates consisting of neoangiogenesis markers and active groups for diagnosing and/or treating tumours by therapy, to novel neoangiogenesis marker conjugates, to agents containing these compounds, and to methods for producing them.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die Erfindung betrifft die Verwendung von Konjugaten aus Neoangiogenese-Markern und Wirkgruppen zur Diagnose und/oder Therapie von Tumoren, sowie neue Neoangiogenese-Marker-Konjugate, diese Verbindungen enthaltende Mittel und Verfahren zu ihrer Herstellung.</p>		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

## Verwendung von Neoangiogenese-Markern für Diagnose und Therapie von Tumoren

- 5 Die Erfindung betrifft den in den Patentansprüchen gekennzeichneten Gegenstand, das heißt die Verwendung von Konjugaten aus Neoangiogenese-Markern bzw. Teilsequenzen von Neoangiogenese-Markern und Wirkgruppen zur Diagnose und Therapie von Tumoren.
- 10 Benigne und maligne Tumoren sind weit verbreitete Krankheiten in den Industrienationen. Maligne Formen stellen eine der häufigsten Todesursachen dar.

- Eine Behandlung von Tumoren erfolgt derzeit auf drei unterschiedlichen Wegen.
- 15 Diese sind chirurgische Entfernung des Tumors, Chemotherapie und Strahlentherapie. Die genannten Methoden sind jedoch mit einer Vielzahl von Nachteilen behaftet und führen nur in einer sehr begrenzten Anzahl von Fällen zum Erfolg. Bei der chirurgischen Entfernung eines Tumors sind wesentliche Voraussetzungen die eindeutige Lokalisierung der Läsion und die gute
- 20 Zugänglichkeit des zu operierenden Bereiches. Bei der Chemotherapie sind in aller Regel gravierende systemische Nebenwirkungen in Kauf zu nehmen. In der Strahlentherapie tritt häufig der Fall ein, daß hypoxische Tumoren nicht auf die Therapie ansprechen bzw. daß nicht-hypoxische Läsionen im Verlauf der Therapie hypoxisch werden und nicht vollständig zerstört werden können. Es
- 25 kommt dann in aller Regel zu einem Rezidiv.

- Stand des Wissens ist, daß Tumore für ihre Versorgung auf Blutgefäße angewiesen sind (J. Folkman, Ann. Intern. Med. 1975, 82: 96-100; J. Folkman, R.S. Cotran, Int. Rev. Exp. Path. 1976, 16: 53-65). Um schneller wachsen zu
- 30 können, sezernieren Tumore Substanzen, die zu Gefäßneubildung (Neovaskularisierung) führen (M.A.J. Gimbrone et al., J. Exp. Med. 1972, 136: 261-276). Bekannte Inhibitoren des Gefäßwachstums sind Angiostatin (M.S. O'Reilly et al., Cell 1994, 79: 315-328) und Endostatin (M.S. O'Reilly et al., Cell

-2-

1997, 88: 277-285). Die Therapie von Tumoren mit diesen Wachstumsinhibitoren führte in Tiermodellen zu gewissen Erfolgen, die aber noch nicht als ausreichend anzusehen sind (M.S. O'Reilly et al., Nat. Med. 1996, 2: 689-692). Taxol (Paclitaxel) hat sich in Tierversuchen als sehr wirksamer Angiogeneshemmer erwiesen, vor allem für Brusttumoren. Epothilone binden noch besser an Mikrotubuli-Bindungsstellen, die im Angiogenese-prozeß eine Rolle spielen und können sogar Taxol aus seiner Bindung verdrängen (D.M. Bollag et al., Cancer Res. 1995, 55: 2325-2333). Epothilone zeichnen sich durch eine hohe cytotoxische Aktivität aus (G. Höfle et al., Angew. Chem. 1996, 108: 1671-1673; M.R. Grever et al., Semin. Oncol. 1992, 35: 1567-1569). Ein Beispiel für einen Rezeptor, der ausschließlich in neu gebildeten Gefäßen exprimiert wird und nicht in Gefäßen, die während des normalen Wachstums entstehen, ist Thy-1 (Lee et al., Circ. Res. 1998, 82: 845-851). Antikörper bzw. Antikörperfragmente gegen Thy-1 sind daher spezifische Marker für Neoangiogenese. Der natürliche Ligand für Thy-1 ist bisher nicht bekannt. Weiterhin wurden gentherapeutische Ansätze beschrieben, die auf die Unterbindung der Neovaskularisierung abzielen (F. Griselli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95: 6367-6372). Aber auch diese Verfahren haben bislang jedoch nicht zu überzeugenden Erfolgen geführt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, Verbindungen zu finden, die zur therapeutischen Behandlung von Tumoren geeignet sind und die die Nachteile der Vorgehensweise des Standes der Technik überwinden.

Diese Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung gelöst.

Es wurde gefunden, daß Konjugate aus Neoangiogenese-Markern, und einer oder mehrerer Wirkgruppen hervorragend zur Diagnose und Therapie von Tumoren geeignet sind.

Die Erfindung betrifft somit neue Konjugate aus Neoangiogenese-Markern und mindestens einer Diagnose- und/oder Wirkgruppe, Verfahren zu deren Herstellung, diese Konjugate enthaltende Mittel, sowie deren Verwendung in der

## Diagnostik und Therapie.

Es wurde gefunden, daß Konjugate aus Neoangiogenese-Markern, und einer Wirk- bzw. Diagnostikgruppe sich nach systemischer (intravenöser oder intraarterieller) oder lokaler (intersititieller oder intratumoraler) Injektion in Geweben anreichern, in denen vermehrt Neoangiogenese stattfindet. Neoangiogenese-Marker sind Verbindungen, die sich speziell in Gebieten von Gefäßneubildungen anreichern, die nicht mit Bereichen der natürlichen Gefäßbildung in der embryonalen Phase (Angiogenese) identisch sind. Neoangiogenese findet praktisch ausschließlich in Tumoren statt (Lee et al., Circ. Res. 1998; 82:845-851).

Überraschenderweise behalten die Neoangiogenese-Marker trotz Kopplung an eine Wirkgruppe ihre hohe Spezifität, so daß auch bei geringer Dosierung eine therapeutisch wirksame Anreicherung der Wirkgruppe am Zielort erreicht werden kann. Auch ist die Verweilzeit der Konjugate lang genug, um den gewünschten therapeutischen Effekt zu erzielen. Die Konzentration in anderen Geweben erreicht bei dieser Dosierung keine toxische Konzentrationen, insbesondere auch deswegen, weil die nicht an die Rezeptorzellen bindenden Wirkgruppen enthaltenden Konjugate überraschend schnell aus dem Körper eliminiert werden und damit die durch ungebundenes Konjugat verursachte Belastung für den Patienten minimal ist. Die beobachteten systemischen Nebenwirkungen sind daher gering.

Überraschenderweise werden darüber hinaus einige der erfindungsgemäßen Konjugate nach Bindung an die Rezeptoren als Substanz-Rezeptor Komplex in die Zelle aufgenommen. Somit gelingt es nicht nur, die Wirkgruppen gezielt an den Krankheitsherd zu transportieren, sondern auch intrazellulär zu deponieren. Vor allem bei solchen Wirkgruppen, welche weniger gut verträglich sind und vornehmlich intrazellulär ihre Wirkungen erzielen, ist dies für eine Therapie von entscheidendem Vorteil.

Als Neoangiogenese-Marker seien beispielhaft die folgenden Verbindungen

-4-

genannt: Antikörper oder deren single-chain Fragmente oder lösliche rekombinante Rezeptoren bzw. am Rezeptor bindende Substrate., die sich richten gegen VEGF(-A,-B,-C,-D), gegen PlGF, aFGF, bFGF, PDGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , HGF, IGF-I, B61/LERK-1, Flk-1, Flk-1/KDR, G-CSF, GM-CSF, TNF- $\alpha$ ,  
5 MCP-1, IL-8, PD-ECGF, Tie-1, Tie-2 und Thy-1 sowie die Verbindungen Paclitaxel und Derivate, Epothilon und Derivate. Außerdem kommen in Frage die antiangiogenen Faktoren Endostatin, 16 kDa Prolactin Fragment, Fibronectin Peptide, TIMP1,2,3,4, PAI-1 und 2, PF4, IP-10, Gro- $\beta$ , Angiopoietin 2, Fumagillin (AGM1470), SCE (Shark Cartilage Extract), Thrombospondin, Angiostatin 2-  
10 Methoxyestradiol und Genistein.

Als Wirkgruppen kommen in Frage Chemotherapeutika, radio-oder photosensibilisierende Substanzen wie z.B. Nitroimidazol oder Porphyrine, Antikörper, Antikörperfragmente, Peptide, Kohlenhydrate oder Oligonukleotide.  
15 Die Wirkgruppen können aber auch radioaktive Metallisotope und deren Metallkomplexe sowie radioaktive Isotope verschiedener Nichtmetalle sein, wobei letztere entweder direkt oder über einen geeigneten Rest an den Neoangiogenese-Marker gebunden sind.

Erfindungsgemäß verwendbar sind Konjugate mit einer oder mehreren  
20 Wirkgruppen, die über geeignete Träger, z.B. Polymere, gebunden sein können.

Als Chemotherapeutika seien beispielhaft genannt Vinblastin, Doxorubicin, Bleomycin, Methotrexat, 5-Fluoruracil, 6-Thioguanin, Cytarabin, Cyclophosphamid und Cisplatin, sowie weitere konventionelle  
25 Chemotherapeutika (siehe z.B. Cancer: Principles and Practice of Oncology, 2ed ed., V.T. De Vita, Jr., S. Hellman, S.A. Rosenberg, J.B. Lippincot Co., Philadelphia, PA, 1985, Kapitel 14). Unter den genannten bevorzugt ist Cisplatin bzw. Platinderivate.

30 Als Wirkgruppe sind weiterhin in experimentellen Studien verwendeten Arzneimittel, wie z.B. Mercaptopurin-, N-Methyl-Formamid-, 2-Amino-1,3,4-thiadiazol-, Melphalan-, Hexamethylmelanin-, Galliumnitrat-, 3% Thymidin-, Dichlormethotrexat-, Mitoguazon-, Sumarin-, Bromdeoxyuridin-, Ioddeoxyuridin-,

-5-

Semustin, 1-(2-Chlorethyl)-3-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1-nitrosoharnstoff-, N,N'-Hexamethylen-bis-acetamid-, Azacitidin-, Dibromdulcitol-, Erwinia-Asparaginase-, Ifosfamid, 2-Mercaptoethansulfonat-, Teniposid-, Taxol-, 3-Deazauridin-, Folsäureantagonist-, Homoharringtonin-, Cyclo-Cytidin-, Acivicin-,  
5 ICRF-187-, Spiromustin-, Levamisol-, Chlorozotocin-, Aziridinybenzochinon-, Spirogermanium-, Aclarubicin-, Pentostatin-, PALA-, Carboplatin-, Amsacrin-, Caracemid-, Iproplatin-, Misonidazol-, Dihydro-5-azacytidin-, 4'-Deoxydoxorubicin-, Menogaril-, Triciribinphosphat-, Fazarabin-, Tiazofurin-, Teroxiron-, Ethiofos-, N-(2-Hydroxyethyl)-2-nitro-1H-imidazol-1-acetamid-, Mitoxantron-,  
10 Acodazol-, Amonafid-, Fludarabinphosphat-, Pibenzimol-, Didemnin B-, Merbaron-, Dihydrolenperon-, Flavon-8-essigsäure-, Oxantrazol-, Ipomeanol-, Trimetrexat-, Deoxyspergualin-, Echinomycin und Dideoxycytidin (vgl. NCI Investigational Drugs, Pharmaceutical Data 1987, NIH Publication No.88-2141, Revised November 1987).

15

Als Wirkgruppe geeignet sind weiterhin Antisense-Oligonucleotide; Aptamer-Oligonucleotide; PTK-Blocker wie z.B. Quercetin, Genistein, Erbstatin, Lavendustatin A, Herbimycin A oder Aeoplysin-1 oder synthetische PTK-Blocker wie z.B. Tyrphostine, S-Aryl-Benzylidenmalononitril-Verbindungen oder  
20 Benzylidenmalononitril (BMN)-Verbindungen.

Als Wirkgruppe kommen auch in Frage Radionuklide enthaltende Gruppen. Erfindungsgemäß einsetzbare Radionuklide umfassen Alpha-, Beta- und/oder Gamma-Strahler, Positronen.Strahler, Auger-Elektronen.Strahler, Röntgen-Strahler und Fluoreszenz-Strahler, wobei beta- oder alpha-Strahler für  
25 therapeutische Zwecke bevorzugt sind.

Entsprechende Radionuklide sind dem Fachmann bekannt und umfassen Radionuklide der Elemente Ag, As, At, Au, Ba, Bi, Br, C, Co, Cr, Cu, F, Fe, Ga, Gd, Hg, Ho, I, In, Ir, Lu, Mn, N, O, P, Pb, Pd, Pt, Pm, Re, Rh, Ru, Sb, Sc, Se, Sm, Sn, Tb, Tc oder Y.

30

Da bei Beta-Emittern der Dosisabfall sehr steil ist, sind Isotope, die sowohl Beta- als auch Gamma-Strahlung emittieren, (z.B. Rhenium-, Yttrium- oder Indiumisotope) besonders bevorzugt.

Die Bindung des Radionuklids an den Neoangiogenese-Marker-Rest erfolgt entweder direkt oder – insbesondere bei metallischen Radionukliden, wie z.B. einem Nuklid der Elemente Ag, As, At, Au, Ba, Bi, Br, C, Co, Cr, Cu, F, Fe, Ga, Gd, Hg, Ho, I, In, Ir, Lu, Mn, N, O, P, Pb, Pd, Pt, Pm, Re, Rh, Ru, Sb, Sc, Se, Sm, Sn, Tb, Tc oder Y - über einen entsprechenden Komplexbildner, der an den Neoangiogenese-Marker gekoppelt ist. Gleiches gilt für Metalle, die als MRI-Kontrastmittel geeignet sind. In beiden Fällen besonders bevorzugt sind Derivate von DTPA, EDTA, TTHA sowie makrozyklische Liganden wie DOTA.

10

Auf Grund ihrer leichten Detektierbarkeit eignen sich Konjugate mit Radionukliden besonders gut, da ein Therapieerfolg leicht mit radiodiagnostischen Methoden überwacht werden kann. Besonders empfindlich sind aber auch Ultraschall- und Nahinfrarot-detektierende Komponenten.

15

Als radiosensibilisierende Wirkgruppen kommen bevorzugt in Frage Nitroimidazolderivate oder andere Verbindungen, die in der Lage sind, bei Bestrahlung mit Röntgenstrahlen freie Radikale abzuspalten.

20

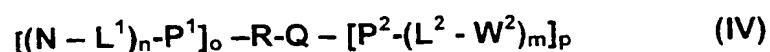
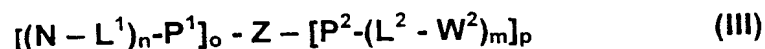
Als photosensibilisierende Wirkgruppen kommen bevorzugt in Frage Porphyrinderivate oder andere Verbindungen, die in der Lage sind, bei Bestrahlung mit Licht freie Radikale abzuspalten.

Somit betrifft die Erfindung neue Neoangiogenese-Marker-Konjugate der Formel

25 I-IV



30





- worin
- N für einen Neoangiogenese-Marker-Rest abgeleitet von Neoangiogenese-Markern, Neoangiogenese-Marker-Teilsequenzen, Neoangiogenese-Rezeptor-Agonisten oder Antagonisten steht,
- 5 L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup> für eine direkte Bindung oder ein Brückenglied, wobei L<sup>1</sup> und L<sup>2</sup> auch identisch sein können,
- Z für eine Zentraleinheit, z.B. ein Kohlenstoff-, Stickstoff-, Phosphor-, Sauerstoff-, Schwefelatom, eine Alkyl- oder Arylgruppe, die von Heteroatomen unterbrochen
- 10 oder mit Heteroatomen substituiert sein kann, und die linear oder verzweigt sein kann,
- P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup> für Polymere steht, die verschieden oder gleich sein können,
- W<sup>1</sup> für eine Wirkgruppe steht, die ein Diagnostikum oder Therapeutikum darstellt,
- 15 wobei das Diagnostikum ein MRI, Röntgen-, Ultraschall- oder Nahinfrarot-Kontrastmittel darstellt und das Therapeutikum ein Chemotherapeutikum, ein Zytostatikum, einen PTK-Blocker, Wachstumsfaktorenhemmer, oder ein Anti-Proliferativum darstellt,
- W<sup>2</sup> für eine Wirkgruppe steht, die ein Diagnostikum, d.h. ein MRI, Röntgen-,
- 20 Ultraschall- oder Nahinfrarot-Kontrastmittel darstellt oder ein Radionuklid der Elemente Ag, As, At, Au, Ba, Bi, Br, C, Co, Cr, Cu, F, Fe, Ga, Gd, Hg, Ho, I, In, Ir, Lu, Mn, N, O, P, Pb, Pd, Pt, Pm, Re, Rh, Ru, Sb, Sc, Se, Sm, Sn, Tb, Tc oder Y enthält oder die abgeleitet ist von einem Arzneimittel, z.B. einem Chemotherapeutikum, einem Zytostatikum, einem PTK-Blocker,
- 25 Wachstumsfaktorenhemmer oder einem Anti-Proliferativum,
- R, Q für Brückenglieder stehen, die so beschaffen sind, daß die Bindung im Körper aufgespalten werden kann; z.B. kann R-Q eine Disulfidgruppe sein oder eine Amid-, Ester-, Anhydrid, Thioamid-, Thioanhydrid- oder Harnstoffgruppe sein,
- n bevorzugt für die Ziffern 1 bis 100 steht,
- m 30 bevorzugt für die Ziffern 1 bis 100 steht,
- o bevorzugt für die Ziffern 1 bis 100 steht,
- p bevorzugt für die Ziffern 1 bis 100 steht,

Als Neoangiogenese-Marker seien beispielhaft die folgenden Verbindungen genannt: Antikörper oder deren single-chain Fragmente oder lösliche rekombinante Rezeptoren bzw. am Rezeptor bindende Substrate, die sich richten gegen VEGF(-A,-B,-C,-D), gegen PIGF, aFGF, bFGF, PDGF, TGF- $\alpha$ ,  
5 TGF- $\beta$ , HGF, IGF-I, B61/LERK-1, Flk-1, Flk-1/KDR, G-CSF, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-8, PD-ECGF, Tie-1, Tie-2 und Thy-1 sowie die Verbindungen Paclitaxel und Derivate, Epothilon und Derivate. Außerdem kommen in Frage die antiangiogenen Faktoren Endostatin, 16 kDa Prolactin Fragment, Fibronectin Peptide, TIMP1,2,3,4, PAI-1 und 2, PF4, IP-10, Gro- $\beta$ , Angiopoetin 2, Fumagillin  
10 (AGM1470), SCE (Shark Cartilage Extract), Thrombospondin, Angiostatin 2-Methoxyestradiol und Genistein.

Als MRI-Diagnostikum kommen Metallchelate von Lanthaniden wie z.B. Gd und  
15 Dy in Frage, aber auch Elemente wie Mn oder supraparamagnetische Teilchen wie z.B. Magnetite. Als Röntgendiagnostikum sind möglich jodhaltige Verbindungen wie z.B. Triojodaromaten, die z.B. auch in Liposomen verpackt sein können. Als Ultraschallkontrastmittel sind einsetzbar Polymere oder andere  
20 partikuläre Einheiten, die Gase enthalten oder freisetzen. Als Nahinfrarotkontrastmittel sind Verbindungen einsetzbar, die bevorzugt bei einer Wellenlänge von 600-1000 nm absorbieren und/oder fluoreszieren und z.B. längere konjugierte Ketten enthalten.

Als Brückenglieder kommen in Frage Kohlenwasserstoffketten, evtl.  
25 unterbrochen durch oder substituiert mit Heteroatomen, Zucker, Peptide oder Oligonucleotide.

Als Polymere geeignet sind dendritische Polymere mit reaktiven Gruppen in der Außenschale, z.B. Aminogruppen, wie sie in WO 93/14147, WO 93/12073, WO  
30 95/02008, WO 95/20619, WO 95/24221, WO 96/02588, EP 684044, EP 672703 und US 5,530,092 beschrieben sind, Polysaccharide wie z.B. Dextran (vgl. EP 0 326 226), Hydroxyethylstärke, Polypeptide wie z.B. Polylysin, das linear oder dendritisch aufgebaut sein kann oder Polynucleotide.

Als Wirkgruppe W<sup>2</sup> seien genannt die Radionuklide der Elemente Ag, As, At, Au, Ba, Bi, Br, C, Co, Cr, Cu, F, Fe, Ga, Gd, Hg, Ho, I, In, Ir, Lu, Mn, N, O, P, Pb, Pd, Pt, Pm, Re, Rh, Ru, Sb, Sc, Se, Sm, Sn, Tb, Tc oder Y.

5

Für die Wirkgruppe W<sup>1</sup> oder W<sup>2</sup> kommen auch in Frage radio- oder photosensibilisierende Wirkgruppen wie z.B. Nitroimidazole oder Porphyrine.

Als Arzneimittel (W<sup>1</sup> oder W<sup>2</sup>) seien beispielhaft genannt Mercaptopurin, N-Methyl-Formamid, 2-Amino-1,3,4-thiadiazol, Melphalan, Hexamethylmelanin, Galliumnitrat, 3% Thymidin, Dichlormethotrexat, Mitoguazon, Sumarin, Bromdeoxyuridin, Ioddeoxyuridin, Semustin, 1-(2-Chlorethyl)-3-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1-nitrosoharnstoff, N,N'-Hexamethylen-bis-acetamid, Azacitidin, Dibromdulcitol, Erwinia-Asparaginase, Ifosfamid, 2-Mercaptoethansulfonat, Teniposid, Taxol, 3-Deazauridin, löslicher Baker's Folsäureantagonist, Homoharringtonin, Cyclo-Cytidin, Acivicin, ICRF-187, Spiromustin, Levamisol, Chlorozotocin, Aziridinylnbenzochinon, Spirogermanium, Aclarubicin, Pentostatin, PALA, Carboplatin, Amsacrin, Caracemid, Iproplatin, Misonidazol, Dihydro-5-azacytidin, 4'-Deoxy-doxorubicin, Menogaril, Triciribinphosphat, Fazarabin, Tiazofurin, Teroxiron, Ethiofos, N-(2-Hydroxyethyl)-2-nitro-1H-imidazol-1-acetamid, Mitoxantron, Acodazol, Amonafid, Fludarabinphosphat, Pibenzimol, Didemnin B, Merbaron, Dihydrolenperon, Flavon-8-essigsäure, Oxantrazol, Ipomeanol, Trimetrexat, Deoxyspergualin, Echinomycin oder Dideoxycytidin.

Als Chemotherapeutika seien beispielhaft genannt Vinblastin, Doxorubicin, Bleomycin, Methotrexat, 5-Fluoruracil, 6-Thioguanin, Cytarabin, Cyclophosphamid und vorzugsweise Cisplatin.

Als Wirkgruppe geeignet sind weiterhin Wachstumsfaktorenhemmer wie z.B. Anti-PDGF [z.B. Triazolopyrimidin (Trepidil®)]; Angiostatin, Endostatin, Anti-Proliferativa wie z.B. Colchizin, Angiopeptin, Estradiol oder Antisense-Oligonukleotide; Aptamer-Oligonukleotide; PTK-Blocker wie z.B. Quercetin, Genistein, Erbstatin, Lavendustin A, Herbimycin A oder Aeoplysinin-1 oder

synthetische PTK-Blocker wie z.B. Tyrphostine, S-Aryl-Benzylidenmalononitril-Verbindungen oder Benzylidenmalononitril (BMN)-Verbindungen.

5 Die Verknüpfung der Wirkgruppen mit den Neoangiogenese-Markern erfolgt je nach Wirkgruppe in an sich bekannter Weise. Dabei können auch geeignete Brückenglieder eingebaut sein, wie z.B. Diamine oder Polyamine, Alkohole, Carbonsäuren oder gemischte Brückengliedern aus Aminen, Alkoholen und/oder Carbonsäuren.

10 So können Tyrosin-Kinase-Hemmer (PTK-Blocker) vom Typ der Tyrphostine z.B. über ihre phenolischen OH-Gruppen an die Peptide von Neoangiogenese-Markern gebunden werden, indem diese zunächst mit cyclischen Anhydriden von aliphatischen und aromatischen Dicarbonsäuren verestert werden und anschließend mit dem N-Terminus des Peptids amidverknüpft werden.

15

Die Verknüpfung von Cisplatin an Neoangiogenese-Marker erfolgt analog zu der von Bogdanov et al. (Bioconjugate Chem. 7 (1996) 144-149) beschriebenen Methode.

20 Die zur Einführung von Wirkstoffen durchgeführte Addition oder Acylierung wird mit Derivaten durchgeführt, die das gewünschte Chelat eventuell gebunden an eine Fluchtgruppe enthalten, oder aus denen der gewünschte Substituent durch die Reaktion generiert wird. Als Beispiele für Additionsreaktionen seien die Umsetzung von Isocyanaten und Isothiocyanaten genannt, wobei die  
25 Umsetzung von Isocyanaten bevorzugt in aprotischen Solventien, z.B. THF, Dioxan, DMF, DMSO, Methylenchlorid bei Temperaturen zwischen 0 und 100°C, bevorzugt zwischen 0 und 50°C, gegebenenfalls unter Zusatz einer organischen Base wie Triethylamin, Pyridin, Lutidin, N-Ethyl-diisopropylamin, N-Methylmorpholin, durchgeführt wird. Die Umsetzung mit Isothiocyanaten wird in  
30 der Regel in Lösungsmitteln wie z.B. Wasser oder niederen Alkoholen wie z.B. Methanol, Ethanol, Isopropanol oder deren Mischungen, DMF, oder Mischungen aus DMF und Wasser bei Temperaturen zwischen 0 und 100°C, bevorzugt zwischen 0 und 50°C, gegebenenfalls unter Zusatz einer organischen Base wie

Triethylamin, Pyridin, Lutidin, N-Ethyldiisopropylamin, N-Methylmorpholin oder Erdalkali-, Alkalihydroxyden wie z.B. Lithium-, Natrium-, Kalium-, Calciumhydroxyd oder deren Carbonate, wie z.B. Magnesiumcarbonat, durchgeführt.

5

Beispiele für Acylierungsreaktionen sind die Umsetzung von freien Carbonsäuren nach den dem Fachmann bekannten Methoden (z.B. J.P. Greenstein et al., Chemistry of the Amino Acids, John Wiley & Sons, N.Y., 1961, S. 943-5). Als vorteilhaft hat sich jedoch erwiesen, die Carboxylgruppe vor der

10 Acylierungsreaktion in eine aktivierte Form wie z.B. Anhydrid, Aktivester oder Säurechlorid zu überführen (z.B. E. Gross et al., The Peptides, Academic Press, N.Y. 1979, vol. 1, S 65-314; N.F. Albertson, Org. React. 1962, 12: 157).

Im Falle der Umsetzung mit Aktivester sei auf die dem Fachmann bekannte

15 Literatur (z.B. Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Band E5, 1985, S. 633) verwiesen. Sie kann unter den oben für die Anhydridreaktion angegebenen Bedingungen durchgeführt werden. Es können aber auch aprotische Lösungsmittel wie z.B. Methylenchlorid oder Chloroform verwendet werden.

20

Bei Säurechlorid-Umsetzungen werden nur aprotische Lösungsmittel wie z.B. Methylenchlorid, Chloroform, Toluol oder THF bei Temperaturen zwischen -20 bis 50°C, bevorzugt zwischen 0 und 30°C, verwendet. Weiterhin sei auf die dem Fachmann vertraute Literatur (z.B. Houben-Weyl, Methoden der organischen

25 Chemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Band 15/2, 1974, S. 355-364) verwiesen.

Schutzgruppen für Carboxylgruppen, die nicht reagieren sollen und während der Umsetzung mit Wirkgruppen oder Neoangiogenese-Markern kurzzeitig

30 geschützt werden sollen, sind Ester mit niederen Alkoholen wie Alkyl-, Aryl- oder Aralkylalkoholen, z.B. Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl-, Phenyl-, Benzyl-, Diphenylmethyl-, Triphenylmethyl-, bis-(p-Nitrophenyl)-methylalkohol sowie Trialkylsilylgruppen.

Die gegebenenfalls gewünschte Abspaltung der Schutzgruppen erfolgt nach den dem Fachmann bekannten Verfahren, z.B. durch Hydrolyse, Hydrogenolyse, alkalische Verseifung der Ester mit Alkali in wäßrig-alkoholischer Lösung bei  
5 Temperaturen von 0 bis 50°C oder im Fall von tert.-Butylestern mit Hilfe von Trifluoressigsäure.

Die Einführung der gewünschten Metallionen in Chelate, bei denen die Wirkstoffe einen Metallkomplex enthalten, erfolgt wie z.B. in DE 34 01 052  
10 beschrieben, indem man das Metalloxid oder ein Metallsalz (z.B. das Nitrat, Acetat, Carbonat, Chlorid oder Sulfat) des Elements in Wasser und/oder einem niederen Alkohol (z.B. Methanol, Ethanol oder Isopropanol) löst oder suspendiert und mit der Lösung oder Suspension der äquivalenten Menge des komplexbildenden Liganden umsetzt und anschließend, falls gewünscht,  
15 vorhandene acide Wasserstoffatome der Säuregruppen durch Kationen von anorganischen und/oder organischen Basen, Aminosäuren oder Aminosäureamiden substituiert.

Die Einführung der gewünschten Metallionen kann sowohl auf der Stufe der  
20 Komplexbildner, d.h. vor der Kopplung an P oder W, als auch nach der Kopplung der unmetallierten Liganden erfolgen.

Die Herstellung der Verbindungen aus Formel II erfolgt dadurch, daß man Polymere, die reaktive Gruppen, z.B. Aminogruppen, Hydroxylgruppen oder  
25 Carboxylgruppen enthalten, die zusätzlich noch aktiviert sein können, zunächst mit Neoangiogenese-Markern, die ebenfalls aktiviert sein können und anschließend mit evtl. aktivierten Wirkstoffen umsetzt. Beispiele für aktivierte Carboxylgruppen sind Anhydride, p-Nitophenylester, N-Hydroxysuccinimidester, Pentafluorphenylester und Säurechloride. Ihre Herstellung und Umsetzung zu  
30 den Endprodukten ist dem Fachmann geläufig.

Die Herstellung der für die Kopplung an N und W benötigten und terminale reaktive Gruppen, z.B. Aminogruppen, tragenden Polymere kann im

allgemeinen von käuflichen bzw. nach oder analog literaturbekannter Methoden herstellbaren Polymeren, z.B. stickstoffhaltigen Kaskadenstartern, wie z.B. Ethylendiamin oder Butylendiamin, erfolgen. Die Einführung nachfolgender Generationen erfolgt nach literaturbekannten Methoden (z.B. J. March, 5 Advanced Organic Chemistry, 3rd ed., John Wiley & Sons, 1985, S. 364-381) durch Acylierungs- bzw. Alkylierungsreaktionen mit die gewünschten Strukturen aufweisenden geschützten Aminen, die zur Bindung an den Kaskadenkern befähigte funktionelle Gruppen wie z.B. Carbonsäuren, Isocyanate, Isothiocyanate oder aktivierte Carbonsäuren (wie z.B. Anhydride, Aktivester, 10 Säurechloride) bzw. Halogenide (wie z.B. Chloride, Bromide, Iodide), Aziridin, Mesylate, Tosylate oder andere dem Fachmann bekannte Fluchtgruppen enthalten.

Die Reinigung der Endverbindungen nach Formel II erfolgt, gegebenenfalls nach 15 Einstellung des pH-Wertes durch Zusatz einer Säure oder Base auf pH 6 bis 8, bevorzugt pH 7, vorzugsweise durch Ultrafiltration mit Membranen geeigneter Porengröße (z.B. Amicon®XM30, Amicon®Ym10, Amicon®YM3) oder Gelfiltration an z.B. geeigneten Sephadex®-Gelen.

20 Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Mittel enthaltend ein in Wasser gelöstes, suspendiertes oder emulgiertes Neoangiogenese-Marker-Konjugat und die in der Galenik üblichen Zusätze und Stabilisatoren. Die Konzentration des Konjugats im Mittel beträgt je nach Anwendung 0,0001 bis 1,0 Mol/l. Sofern das Neoangiogenese-Marker-Konjugat als Wirkgruppe einen Komplex mit einem 25 kurzlebigen Radioisotop trägt, werden die entsprechenden Mittel als Kit bereitgestellt, wobei in einem Behälter der Neoangiogenese-Marker gekoppelt an den metallfreien Komplexbildner vorliegt. Zu diesem wird unmittelbar vor der Verabreichung das gewünschte Radioisotop gegeben.

30 Die Mittel werden bevorzugt systemisch, d.h. intravenös oder intraarteriell appliziert. So erlaubt diese Applikationsart, daß auch Metastasen oder solche Läsionen, die noch sehr klein sind und diagnostisch nicht erfaßt werden können, aber besonders gut z.B. auf die Therapie mit Tyrosinkinasehemmern,

Antimetaboliten oder ionisierender Strahlen ansprechen, gezielt erreicht werden können.

Alternativ können die Mittel auch über einen speziellen Katheter lokal an die  
5 Läsion verbracht werden. Dadurch wird kurzfristig eine mehr als 1000-fach  
höhere Konzentration am gewünschten Ort als nach intravenöser Applikation  
erreicht (Levitzki 1992, FASEB 6, 3275-3282) und eine weitere Steigerung der  
Selektivität erzielt.

10 Weitere Möglichkeiten ergeben sich durch lokale Verabreichungsarten, wie z.B.  
interstitielle Injektion oder die Verabreichung direkt in einen Tumor.

Die jeweils applizierte Menge richtet sich nach der jeweiligen Wirkgruppe und  
der Größe der Läsion. Als orientierender oberer Grenzwert kann ein Wert  
15 angenommen werden, wie er auch bei Verabreichung des reinen Wirkstoffs  
verwendet werden würde. Auf Grund des wirkungsverstärkenden Effekts sowie  
der Möglichkeit den Wirkstoff spezifisch (über einen Katheter) einzubringen, liegt  
die erforderliche Dosis im allgemeinen jedoch weit unter diesem oberen  
Grenzwert.

20

Die nachfolgenden Beispiele dienen der näheren Erläuterung des  
Erfindungsgegenstandes, ohne ihn auf diese beschränken zu wollen.



**Beispiel 1**

## Verknüpfung von Erbstatin mit Paclitaxel

Erbstatin wird umgesetzt mit Bernsteinsäureanhydrid in aprotischen Solventien wie THF unter Zusatz einer nukleophil-freien Base wie Diisopropyl-ethylamin. Das entstandene Ammoniumsalz des Bernsteinsäure-monophenylesters wird ohne weitere Aufreinigung mit Paclitaxel unter Zusatz von DCCl und N-Hydroxysuccinimid umgesetzt. Nach Abtrennung des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffs werden die flüchtigen Komponenten abgetrennt und das Produkt durch Chromatographie gereinigt.

**Beispiel 2**

Verknüpfung von Carboxylgruppen enthaltenden Wirkstoffen mit Thy-1-Antikörpern

## a) Herstellung von Antikörpern gegen Thy-1

Die Herstellung von Antikörpern gegen Thy-1 erfolgt wie in der Literatur beschrieben (Lee et al., Circ. Res. 1998; 82:845-851).

b) Verknüpfung von Carboxylgruppen enthaltenden Wirkstoffen mit Thy-1-Antikörpern

Carboxylgruppen enthaltende Wirkstoffe werden in DMF mit dem Thy-1-Antikörper unter Zusatz von DCCl und N-Hydroxysuccinimid (NHS) umgesetzt. Nach Abtrennung des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffs wird NHS durch Extraktion mit Bicarbonatlösung abgetrennt, das DMF abgezogen und das Produkt chromatographisch gereinigt.

**Beispiel 3**

Verknüpfung von N',N',N'',N'''-Tetrakis(tert.-butyloxycarboxy-methyl)-N''-(hydroxy-carboxy-methyl)-diethylen-triamin mit Thy-1-Antikörpern

## a) Herstellung von Antikörpern gegen Thy-1

Die Herstellung von Antikörpern gegen Thy-1 erfolgt wie in der Literatur

beschrieben (Lee et al., Circ. Res. 1998; 82:845-851).

b) NHS-Ester des N',N',N''',N'''-Tetrakis(tert.-butyloxycarboxy-methyl)-N''-(hydroxy-carboxy-methyl)-diethylen-triamins

5 10 mmol N',N',N''',N'''-Tetrakis(tert.-butyloxycarboxy-methyl)-N''-(hydroxy-carboxy-methyl)-diethylen-triamin und 10 mmol N-Hydroxy-succinimid werden in 90 ml absolutem Dimethylformamid gelöst. Anschließend tropft man 10 mmol Dicyclohexylcarbodiimid, gelöst in 10 ml absoluten Dimethylformamid, zum Reaktionsgemisch. Man rührt 30 min bei Raumtemperatur, filtriert und erhält  
10 eine 0.1 molare Lösung des NHS-Esters. Diese wird für die folgenden Kopplungsreaktionen ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

c) N-[N',N',N''',N'''-Tetrakis (hydroxy-carboxy-methyl)-N''-(carboxy-methyl)-diethylin-triamino]-Thy-1-Antikörper

15 10 mg Thy-1-Antikörper werden in 100 ml DMF in Lösung gebracht. Unter Argonatmosphäre tropft man 10 ml einer 0.1 molaren Lösung des NHS-Esters des N',N',N''',N'''-Tetrakis(tert.-butyloxycarboxy-methyl)-N''-(hydroxy-carboxy-methyl)-diethylen-triamins (hergestellt wie unter Beispiel 3a beschrieben) hinzu und rührt das Reaktionsgemisch 6 h bei Raumtemperatur. Anschließend wird  
20 filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Zur Spaltung der tert.-Butylester wird der weiße Rückstand mit 150 ml eines Gemisches aus Trifluoressigsäure: Anisol: Ethandithiol (95:2,5:2,5) behandelt. Anschließend wird im Vakuum bei Raumtemperatur aufkonzentriert (ca. 15-20 ml) und auf 150 ml absoluten Diethylether gegossen. Der weiße Niederschlag wird abgesaugt  
25 und durch Chromatographie an Kieselgel RP-18 aufgereinigt.

c) In-111-Komplex des N-[N',N',N''',N'''-Tetrakis-(hydroxycarboxy-methyl)-N''-(carboxy-methyl)-diethylen-triamino]-Thy-1-Antikörper

1 mg N-[N',N',N''',N'''-Tetrakis (hydroxy-carboxy-methyl)-N''-(carboxy-methyl)-  
30 diethylin-triamino]-Thy-1-Antikörper (Beispiel 3b) wird in 1 ml 0.1 molarer Natriumacetat-Lösung (pH=6) gelöst und mit 1 mCi Indium-111-tri-chlorid-Lösung (Amersham) versetzt. Man läßt das Reaktionsgemisch 10 min bei Raumtemperatur stehen. Die Markierungsausbeute wird durch HPLC-Analytik

bestimmt und ist größer als 95%.

d) Y-90-Komplex des N-[N',N',N''',N'''-Tetrakis (hydroxy-carboxy-methyl)-N''-(carboxy-methyl)-diethylen-triamino]-Thy-1-Antikörper

- 5 1 mg N-[N',N',N''',N'''-Tetrakis (hydroxy-carboxy-methyl)-N''-(carboxy-methyl)-diethylen-triamino]-Thy-1-Antikörper (Beispiel 3b) wird in 1 ml 0.1 molarer Natriumacetat-Lösung (pH=6) gelöst und mit 1 mCi Yttrium-90-trichlorid (Amersham) versetzt. Man läßt das Reaktionsgemisch 10 min bei Raumtemperatur stehen. Die Markierungsausbeute wird durch HPLC-Analytik  
10 bestimmt und ist größer 94%.

e) Rhenium-186- N-[N',N',N''',N'''-Tetrakis (hydroxy-carboxy-methyl)-N''-(carboxy-methyl)-diethylen-triamino]-Thy-1-Antikörper

- 1 mg N-[N',N',N''',N'''-Tetrakis (hydroxy-carboxy-methyl)-N''-(carboxy-methyl)-  
15 diethylen-triamino]-Thy-1-Antikörper in 600 µl Phosphatpuffer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 mol/l, pH=8,5) werden mit 100 µl einer 0.15 molaren Trinatriumcitratdihydrat-Lösung, 500 µCi 186-Perrhenat-Lösung und abschließend mit 5 µl einer 0.2 molaren Zinn(II)chlorid-Dihydratlösung versetzt. Man inkubiert 10 min bei Raumtemperatur. Die Analytik der Markierung erfolgt mittels HPLC.

20

#### Beispiel 4

Technetium-99m-markierter Thy-1-Antikörper

a) Herstellung von Antikörpern gegen Thy-1

- 25 Die Herstellung von Antikörpern gegen Thy-1 erfolgt wie in der Literatur beschrieben (Lee et al., Circ. Res. 1998; 82:845-851).

b) DTPA-Thy-1

- Eine Lösung von 50 mg Thy-1-Antikörper in 50 ml Wasser wird mit 1 N  
30 Natronlauge auf einen pH-Wert von 9,5 eingestellt. Anschließend gibt man DTPA-Monoanhydrid-monoethylester hinzu, wobei der pH-Wert der Reaktionslösung durch Zugabe von 1 N Natronlauge konstant bei 9,5 gehalten wird. Nach beendeter Zugabe wird noch 15 Minuten bei Raumtemperatur

-18-

nachgerührt und anschließend der pH-Wert der Reaktionslösung durch Zugabe von 32%iger Natronlauge auf 11,5 eingestellt. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden bei Raumtemperatur wird mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 200 ml aufgefüllt. Die so erhaltene Produktlösung wird  
5 dreimal mittels einer YM3-Ultrafiltrationsmembran (cut-off 3000 Da; Amicon®) gegen destilliertes Wasser ultrafiltriert. Der verbleibende Rückstand wird mit entionisiertem Wasser auf ein Volumen von 500 ml aufgefüllt und die wäßrige Produktlösung gefriergetrocknet.

10 c) Technetium-99m- DTPA-Thy-1-Antikörper

1 mg DTPA-Thy-1-Antikörper in 600 µl Phosphatpuffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 mol/l, pH=8,5) werden mit 100 µl einer 0.15 molaren Trinatriumcitratdihydrat-Lösung, 500 µCi 99m-Per technetat-Lösung und abschließend mit 5 µl einer 0.2 molaren Zinn(II)chlorid-Dihydratlösung versetzt. Man inkubiert 10 min bei  
15 Raumtemperatur. Die Analytik der Markierung erfolgt mittels HPLC.

### Beispiel 5

#### Jodmarkierter Thy-1-Antikörper

20 a) Herstellung von Antikörpern gegen Thy-1

Die Herstellung von Antikörpern gegen Thy-1 erfolgt wie in der Literatur beschrieben (Lee et al., Circ. Res. 1998; 82:845-851).

b) Jodmarkierung von Thy-1-Antikörpern

25 Die Markierung von Antikörpern mit radioaktivem Jod ( $\text{I-123}$ ,  $\text{I-125}$  oder anderen Jodisotopen) ist dem Fachmann geläufig.

### Beispiel 6

30 Polymer mit Metallkomplex und Thy-1-Antikörper

a) Herstellung des Polymers

Ein Kaskadenpolymer erhalten aus Diaminobutan und nachfolgender Umsetzung mit Vinylcyanid mit 32 terminalen Aminogruppen wird in WO

93/14147, WO 93/12073, WO 95/02008, WO 95/20619, WO 95/24221, WO 96/02588, EP 684044, EP 672703 oder US 5,530,092 beschrieben hergestellt oder – alternativ – käuflich erworben (Firma DSM, Niederlande).

5    b) Kopplung des Metallkomplexes

Ein aktiviertes Chelat auf der Basis von Cyclen, Gly-Me-DOTA (10-[1-Carboxymethylcarbamoyl)-ethyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triessigsäure-tri-tert-butylester) mit drei durch tert.-Butylgruppen geschützten Carboxylgruppen wird wie in DE 3938992 beschrieben mit dem Polymer umgesetzt. Die Reaktion der Aminogruppen mit der Carboxylgruppe von Gly-Me-DOTA erfolgt dabei durch Vermittlung von Dicyclohexylcarbodiimid. Es wird darauf geachtet, daß die molare Menge an Gly-Me-DOTA so gewählt wird, daß nicht alle derivatisierbaren Aminogruppen des Polymers umgesetzt werden.

15    c) Kopplung des Thy-1-Antikörpers

Der in Beispiel 2a hergestellte Thy-1-Antikörper wird mit der in Beispiel 6b erhaltenen Verbindung unter Vermittlung von Dicyclohexylcarbodiimid in Analogie zur Umsetzung mit dem Chelatbildner umgesetzt.

20    Alternativ können der Chelatbildner und der Thy-1-Antikörper auch in einem Schritt mit dem Polymer umgesetzt werden, wobei darauf zu achten ist, daß die molaren Mengen der beiden Reaktanden so gewählt werden, daß sie kleiner sind als die Summe der molaren Menge an derivatisierbaren Aminogruppen des Polymers.

25

d)    Technetium-99m- Gly-Me-DOTA-Thy-1-Antikörper-Polymer-Konjugat

Die Markierung der in Beispiel 6c erhaltenen Verbindung mit radioaktivem Technetium-99m erfolgt wie in Beispiel 4c beschrieben. Dabei werden 1 mg Gly-Me-DOTA-Thy-1-Antikörper-Polymer-Konjugat in 600 µl Phosphatpuffer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 mol/l, pH=8,5) mit 100 µl einer 0.15 molaren Trinatriumcitratdihydrat-Lösung, 500 µCi 99m-Per technetat-Lösung und abschließend mit 5 µl einer 0.2 molaren Zinn(II)chlorid-Dihydratlösung versetzt. Man inkubiert 10 min bei Raumtemperatur. Die Analytik der Markierung erfolgt

30

mittels HPLC.

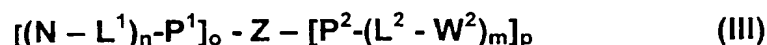
### Beispiel 7

#### 5 Diagnose von Tumoren mittels Gammakamera

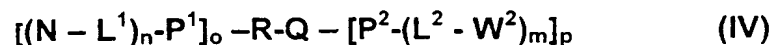
Narkotisierte weiße Neuseeländer-Kaninchen (3-4 kg) mit implantierten Tumoren (VX2) erhalten eine intravenöse Injektion einer Lösung von Rhenium-186- N-[N',N',N'',N'''-Tetrakis (hydroxy-carboxy-methyl)-N''-(carboxy-methyl)-diethylen-triamino]-Thy-1-Antikörper mit einer Aktivität von 10 MBq in einem  
10 Volumen von 1 ml. Über einen Zeitraum von 1h, nach 2, 4, 6, 8, 12 und 24 Stunden werden Szintigramme mit einer handelsüblichen Gammakamera angefertigt. Die Tumoren werden anhand der erhöhten Strahlungsintensität identifiziert.

## Patentansprüche

1. Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) bis (IV)



10



worin

N für einen Neoangiogenese-Marker-Rest abgeleitet von Neoangiogenese-Markern, Neoangiogenese-Marker-Teilsequenzen, Neoangiogenese-Rezeptor-Agonisten oder Antagonisten oder Antikörpern bzw. Fragmenten von Antikörpern steht,

$L^1, L^2$  für eine direkte Bindung oder ein Brückenglied steht, wobei  $L^1$  und  $L^2$  auch identisch sein können,

Z20 für eine Zentraleinheit, z.B. ein Kohlenstoff-, Stickstoff-, Phosphor-, Sauerstoff-, Schwefelatom, eine Alkyl- oder Arylgruppe, die von Heteroatomen unterbrochen oder mit Heteroatomen substituiert sein kann, und die linear oder verzweigt sein kann,

$P^1, P^2$  für Polymere steht, die verschieden oder gleich sein können und zu 25 Verknüpfungen mit  $L^1, L^2$  bzw. Z, R und Q durch die Anwesenheit funktioneller Gruppen geeignet sind,

$W^1$  für eine Wirkgruppe steht, die ein Diagnostikum oder Therapeutikum darstellt, wobei das Diagnostikum ein MRI-, Röntgen-, Ultraschall- oder Nahinfrarot-Kontrastmittel darstellt und das Therapeutikum eine radio-oder 30 photosensibilisierende Substanz, ein Chemotherapeutikum, einen PTK-Blocker, Wachstumsfaktorenhemmer, ein Anti-Proliferativum oder einen Antikörper, ein Antikörperfragment, Peptid, Kohlenhydrat oder Oligonucleotid darstellt,

$W^2$  für eine Wirkgruppe steht, die ein Diagnostikum, d.h. ein MRI, Röntgen-,

- Ultraschall- oder Nahinfrarot-Kontrastmittel darstellt oder ein Radionuklid der Elemente Ag, As, At, Au, Ba, Bi, Br, C, Co, Cr, Cu, F, Fe, Ga, Gd, Hg, Ho, I, In, Ir, Lu, Mn, N, O, P, Pb, Pd, Pt, Pm, Re, Rh, Ru, Sb, Sc, Se, Sm, Sn, Tb, Tc oder Y enthält oder die abgeleitet ist von einer radio-oder photosensibilisierenden Substanz, einem Arzneimittel, bevorzugt einem Chemotherapeutikum, einem Zytostatikum, einem PTK-Blocker, einem Wachstumsfaktorenhemmer oder einem Anti-Proliferativum,
- R, Q für Brückenglieder stehen, die so beschaffen sind, daß die Bindung im Körper aufgespalten werden kann; wobei R-Q bevorzugt eine Disulfidgruppe oder eine Amid-, Ester-, Anhydrid, Thioamid-, Thioanhydrid- oder Harnstoffgruppe ist,
- n bevorzugt für die Ziffern 1 bis 100 steht,
- m bevorzugt für die Ziffern 1 bis 100 steht,
- o bevorzugt für die Ziffern 1 bis 100 steht,
- p bevorzugt für die Ziffern 1 bis 100 steht,
- als Diagnostikum und/oder als Therapeutikum zur Diagnose und/oder Behandlung von Tumoren.
2. Verwendung nach Anspruch 1, worin der Neoangiogenese-Marker ein Antikörper oder ein single-chain Fragment oder löslicher rekombinanter Rezeptor bzw. Substrat ist, welche sich richtet gegen VEGF(-A,-B,-C,-D), gegen PlGF, aFGF, bFGF, PDGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , HGF, IGF-I, B61/LERK-1, Flk-1, Flk-1/KDR, G-CSF, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-8, PD-ECGF, Tie-1, Tie-2 und Thy-1 sowie die Verbindungen Paclitaxel und Derivate, Etoposid und Derivate.
3. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin der Neoangiogenese-Marker die antiangiogenen Faktoren Endostatin, 16 kDa Prolactin Fragment, Fibronectin Peptide, TIMP1,2,3,4, PAI-1 und 2, PF4, IP-10, Gro- $\beta$ , Angiopoetin 2, Fumagillin (AGM1470), SCE (Shark Cartilage Extract), Thrombospondin, Angiostatin, 2-Methoxyestradiol und Genistein sind.
4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin die Wirkgruppe einen Alpha-, Beta- und/oder Gamma-Strahler, Positronen-Strahler, Auger-Elektronen-Strahler, Röntgen-Strahler und/oder einen Fluoreszenz- oder



Phosphoreszenz-Strahler enthält.

5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin die Wirkgruppe ein Radionuklid der Elemente Ag, As, At, Au, Ba, Bi, Br, C, Co, Cr, Cu, F, Fe, Ga, Gd, Hg, Ho, I, In, Ir, Lu, Mn, N, O, P, Pb, Pd, Pt, Pm, Re, Rh, Ru, Sb, Sc, Se, Sm, Sn, Tb, Tc oder Y enthält.
6. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin die Wirkgruppen sich ableiten von einem Metallkomplex eines Radionuklids der Elemente Ag, As, Au, Bi, Cu, Ga, Gd, Hg, Ho, In, Ir, Lu, Pb, Pd, Pm, Pr, Re, Rh, Ru, Sb, Sc, Se, Sm, Sn, Tb, Tc oder Y.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 6, worin das Radionuklid  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{90}\text{Y}$  oder  $^{111}\text{In}$  ist.
8. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Wirkstoff W eine radiosensibilisierende Verbindung darstellt.
9. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Wirkstoff W ein Nitroimidazolderivat darstellt.
10. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Wirkstoff W eine photosensibilisierende Verbindung darstellt.
11. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Wirkstoff W ein Porphyrinderivat darstellt.
12. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Arzneimittel ein Chemotherapeutikum, ein Zytostatikum, ein PTK-Blocker, Wachstumsfaktorenhemmer oder Anti-Proliferativum ist.
13. Verbindung gemäß allgemeiner Formel (I) bis (IV) aus Anspruch 1, worin die Wirkgruppe  $W^1$  oder  $W^2$  Vinblastin-, Doxorubicin-, Bleomycin-, Methotrexat-, 5-

Fluoruracil-, 6-Thioguanin-, Cytarabin-, Cyclophosphamid- oder ein Cisplatin-Rest ist.

14. Verbindung gemäß allgemeiner Formel (I) bis (IV) aus Anspruch 1, worin die  
5 Wirkgruppe  $W^1$  oder  $W^2$  sich ableitet von einem Quercetin-, Genistein-, Erbstatin-, Lavendustin A-, Herbimycin A-, Aeoplysinin-1-Tyrphostine-, S-Aryl-Benzylidenmalononitril- oder Benzylidenmalononitril-Rest.
15. Verbindung gemäß allgemeiner Formel (I) bis (IV) aus Anspruch 1, worin die  
10 Wirkgruppe  $W^1$  oder  $W^2$  sich ableitet von einem Mercaptopurin-, N-Methyl-Formamid-, 2-Amino-1,3,4-thiadiazol-, Melphalan-, Hexamethylmelanin-, Galliumnitrat-, 3% Thymidin-, Dichlormethotrexat-, Mitoguazon-, Sumarin-, Bromdeoxyuridin-, Ioddeoxyuridin-, Semustin, 1-(2-Chlorethyl)-3-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1-nitrosoharnstoff-, N,N'-Hexamethylen-bis-acetamid-, Azacitidin,  
15 Dibromdulcitol-, Erwinia-Asparaginase-, Ifosfamid, 2-Mercaptoethansulfonat-, Teniposid-, Taxol-, 3-Deazauridin-, Folsäureantagonist, Homoharringtonin-, Cyclo-Cytidin-, Acivicin-, ICRF-187-, Spiromustin-, Levamisol-, Chlorozotocin-, Aziridinybenzochinon-, Spirogermanium-, Aclarubicin-, Pentostatin-, PALA-, Carboplatin-, Amsacrin-, Caracemid-, Iproplatin-, Misonidazol-, Dihydro-5-  
20 azacytidin-, 4'-Deoxy-doxorubicin-, Menogaril-, Triciribinphosphat-, Fazarabin-, Tiazofurin-, Teroxiron-, Ethiofos-, N-(2-Hydroxyethyl)-2-nitro-1H-imidazol-1-acetamid-, Mitoxantron-, Acodazol-, Amonafid-, Fludarabinphosphat-, Pibenzimol-, Didemnin B-, Merbaron-, Dihydrolenperon-, Flavon-8-essigsäure-, Oxantrazol-, Ipomeanol-, Trimetrexat-, Deoxyspergualin-, Echinomyzin oder  
25 einem Dideoxycytidin-Rest.
16. Verbindung gemäß allgemeiner Formel (I) bis (IV) aus Anspruch 1, worin die  
Wirkgruppe  $W^1$  oder  $W^2$  sich ableitet von einem Anti-PDGF oder einem Triazolopyrimidin.
- 30
17. Verbindung gemäß allgemeiner Formel (I) bis (IV) aus Anspruch 1, worin die  
Wirkgruppe  $W^1$  oder  $W^2$  sich ableitet von Colchizin, Angiopeptin, Estradiol oder einem ACE-Hemmer.

18. Verbindung gemäß allgemeiner Formel (I) bis (IV) aus Anspruch 1, worin die Wirkgruppe  $W^1$  oder  $W^2$  sich ableitet von Simvastatin oder Probucol.
19. Therapeutische Mittel enthaltend eine Verbindung nach einem der vorangehenden Ansprüche gelöst, emulgiert oder suspendiert in einem Medium, bevorzugt einem wäßrigen Medium mit den in der Galenik üblichen Hilfsstoffen, Zusätzen und/oder Stabilisatoren.
20. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I-IV) gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Neoangiogenese-Marker an ein Diagnostikum oder Therapeutikum gekoppelt wird.
21. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I-IV) gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Neoangiogenese-Marker über ein Brückenglied an einen Wirkstoff gekoppelt wird.
22. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (II-IV) gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Neoangiogenese-Marker und ein oder mehrere Wirkstoffe an ein gemeinsames Trägermolekül gekoppelt werden.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> <b>A61K 49/00, 47/48, 51/10, 49/04</b>		<b>A3</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/18439</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. April 2000 (06.04.00)</b>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP99/07198 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 29. September 1999 (29.09.99) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 45 798.7      29. September 1998 (29.09.98)      DE <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, D-13342 Berlin (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> KRAUSE, Werner [DE/DE]; Turmfalkenstrasse 39a, D-13505 Berlin (DE). MUSCHICK, Peter [DE/DE]; Biesenthaler Weg 3, D-16321 Ladeburg (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, ES, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <b>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenrichts:</b> 14. September 2000 (14.09.00)	
<b>(54) Title:</b> USE OF NEOANGIOGENESIS MARKERS FOR DIAGNOSING AND TREATING TUMOURS BY THERAPY <b>(54) Bezeichnung:</b> VERWENDUNG VON NEOANGIOGENESE-MARKERN FÜR DIAGNOSE UND THERAPIE VON TUMOREN <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to the use of conjugates consisting of neoangiogenesis markers and active groups for diagnosing and/or treating tumours by therapy, to novel neoangiogenesis marker conjugates, to agents containing these compounds, and to methods for producing them.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die Erfindung betrifft die Verwendung von Konjugaten aus Neoangiogenese-Markern und Wirkgruppen zur Diagnose und/oder Therapie von Tumoren, sowie neue Neoangiogenese-Marker-Konjugate, diese Verbindungen enthaltende Mittel und Verfahren zu ihrer Herstellung.</p>			

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

onal Application No

PCT/EP 99/07198

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K49/00 A61K47/48 A61K51/10 A61K49/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 87 04164 A (UNIV MELBOURNE) 16 July 1987 (1987-07-16) page 21, line 8-24; figure 10; tables 1,2	1,2,4-6, 8,19-21
Y	LEE W S ET AL: "Thy - 1, a novel marker for angiogenesis upregulated by inflammatory cytokines 'see comments!' CIRCULATION RESEARCH,US,GRUNE AND STRATTON, BALTIMORE, vol. 82, no. 8, 4 May 1998 (1998-05-04), pages 845-851, XP002119748 ISSN: 0009-7330 cited in the application the whole document	1,2,4-6, 8,19-21



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 June 2000

Date of mailing of the international search report

15/06/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Veronese, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No

PCT/EP 99/07198

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	WO 99 45951 A (LEE WEN SEN ; SHAW SHYH YU (CN); JAIN MUKESH K (US); HABER CAROL EF) 16 September 1999 (1999-09-16) page 19, line 1-41; claims	1, 2, 4-6, 8, 19-21
Y	WO 97 31655 A (CASORATI GIULIA ; CORTI ANGELO (IT); DELLABONA PAOLO (IT); PELAGI M) 4 September 1997 (1997-09-04) examples 1.3, 1.5, 1.6, 2, 2.3 page 14, line 4	1, 2, 4-6, 8, 19-21
Y	AL-YAHYAE S A S ET AL: "CELL TARGETING OF A PORE-FORMING TOXIN, CYTA BETA-ENDOTOXIN FROM BACILLUS THURINGIENSIS SUBSPECIES ISRAELENIS, BY CONJUGATING CYTA WITH ANTI-THY 1 MONOCLONAL ANTIBODIES AND INSULIN" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, US, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, vol. 7, no. 4, 1 July 1996 (1996-07-01), pages 451-460, XP000637463 ISSN: 1043-1802 the whole document	1, 2, 4-6, 8, 19-21
P, Y	WO 98 47541 A (COCKBAIN JULIAN R M ; KLAIVENESS JO (NO); NAEVESTAD ANNE (NO); NYCOM) 29 October 1998 (1998-10-29) the whole document	1, 2, 4-6, 8, 19-21
P, Y	WO 99 40947 A (ESHIMA DENNIS ; POLLAK ALFRED (CA); THORNBACK JOHN (CA); FAUCONNIER) 19 August 1999 (1999-08-19) the whole document	1, 2, 4-6, 8, 19-21
A	WO 97 33552 A (LI CHUN ; WALLACE SIDNEY (US); YU DONG FANG (US); WALLACE TECH INC) 18 September 1997 (1997-09-18) page 14, line 21 -page 15, line 11 example 1 claims 1, 4-11 figures 1-5	1, 2
A	WO 97 19938 A (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION ; AMAT GUERRI FRANCISCO (ES); SOUTO) 5 June 1997 (1997-06-05) the whole document	1, 2
A	EP 0 781 778 A (PHARMACHEMIE BV) 2 July 1997 (1997-07-02) the whole document	1, 2

-/-



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 99/07198

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>NERI D ET AL: "Targeting by affinity-matured recombinant antibody fragments of an angiogenesis associated fibronectin isoform" NATURE BIOTECHNOLOGY,US,NATURE PUBLISHING, vol. 15, no. 12, November 1997 (1997-11), pages 1271-1275, XP002124779 ISSN: 1087-0156 page 1271, column 1 -page 1272, column 1</p>	1,2,4,6, 8,19-21
A	<p>ARAP W ET AL: "CANCER TREATMENT BY TARGETED DRUG DELIVERY TO TUMOR VASCULATURE IN A MOUSE MODEL" SCIENCE,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, vol. 279, 16 January 1998 (1998-01-16), pages 377-380, XP000857470 ISSN: 0036-8075 page 378, column 1 -page 379, column 1 figure 3 page 380, column 1-2</p>	1,2,4,6, 8,19-21
A	<p>WO 95 12414 A (REPLIGEN CORP) 11 May 1995 (1995-05-11) page 4, line 28 -page 5, line 5 page 6, line 12-17 page 9, line 11-14 page 15, line 13 -page 16, line 10 page 44, line 30 claims; examples 10,17,22,24,31,36</p>	1,2,4,6, 8,19-21

The International Searching Authority has established that this international application contains multiple (groups of) inventions as follows:

1. Claim nos.: 1, 2, 4-8, 12, 19-21

Use of conjugates consisting of Thy-1 antibodies and diagnostic active groups for diagnosing tumors, said diagnostic active groups being chosen from the following: iodine-123, iodine-125 or a complex of one of the following metals: indium-111, Y-90, rhenium-186, technetium-99.

2. Claim nos.: 1, 2, 4-8, 12, 19-21

Use of conjugates consisting of Thy-1 antibodies and therapeutic active groups for diagnosing tumors, said therapeutic active groups being chosen from the following: iodine-123, iodine-125 or a complex of one of the following metals: indium-111, Y-90, rhenium-186, technetium-99.

3. Claim nos.: 1, 2, 12, 14, 19-21

Use of conjugates consisting of erbstatin and paclitaxel for treating tumors.

Continued from field I.2

Claim nos.: 3, 9-11, 13, 15-18, 22

Patent claim nos. 1-22 relate to a disproportionately large number of possible compounds/products. These claims actually cover so many options and possible permutations that they are so unclear and so imprecise within the meaning of PCT Article 6 that a meaningful search is impossible. The search was therefore restricted to those parts of the claims which can be considered clear and precise, namely the compounds that are cited in the examples of embodiments (Th-1 antibodies - radionuclide conjugates) and (erbstatin-paclitaxel conjugates). Only the items which were adequately disclosed in the description and supported by the description are listed under the objection as to the lack of uniformity of the invention.

Claims which were not searched completely: 1, 2, 4-8, 12, 14, 19-21

Claims which were not searched: 3, 9-11, 13, 15-18, 22

The applicant is advised that patent claims or parts of patent claims relating to inventions for which no international search has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). As a general rule, the EPO in its capacity as the authority entrusted with the task of carrying out an international preliminary examination will not conduct a preliminary examination for subjects in respect of which no search has been provided. This also applies to cases where the patent claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or to cases where the applicant presents new patent claims in keeping with the PCT Chapter II procedure.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Patent Application No

PCT/EP 99/07198

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 8704164	A	16-07-1987	AU 6843287	A	28-07-1987
			EP 0252951	A	20-01-1988
WO 9945951	A	16-09-1999	NONE		
WO 9731655	A	04-09-1997	IT MI960358	A	27-08-1997
			AU 1769497	A	16-09-1997
			CA 2247308	A	04-09-1997
			EP 0885015	A	23-12-1998
WO 9847541	A	29-10-1998	AU 4718297	A	22-05-1998
			AU 4786697	A	22-05-1998
			AU 4786797	A	22-05-1998
			AU 4787097	A	22-05-1998
			AU 7068798	A	13-11-1998
			BG 103438	A	31-01-2000
			BG 103439	A	31-01-2000
			BR 9712683	A	19-10-1999
			CN 1238700	A	15-12-1999
			CN 1234742	A	10-11-1999
			CZ 9901494	A	15-09-1999
			EP 0973552	A	26-01-2000
			EP 0991427	A	12-04-2000
			EP 0963209	A	15-12-1999
			EP 0977600	A	09-02-2000
			WO 9818500	A	07-05-1998
			WO 9818501	A	07-05-1998
			WO 9818495	A	07-05-1998
			WO 9818498	A	07-05-1998
			NO 991889	A	28-06-1999
			NO 991890	A	28-06-1999
WO 9940947	A	19-08-1999	AU 2406699	A	30-08-1999
WO 9733552	A	18-09-1997	AU 2580697	A	01-10-1997
			BR 9710646	A	11-01-2000
			CA 2250295	A	18-09-1997
			CN 1217662	A	26-05-1999
			CZ 9802908	A	14-07-1999
			EP 0932399	A	04-08-1999
			NO 984210	A	11-11-1998
			PL 328807	A	15-02-1999
			US 5977163	A	02-11-1999
WO 9719938	A	05-06-1997	ES 2105983	A	16-10-1997
			ES 2121549	A	16-11-1998
EP 0781778	A	02-07-1997	CA 2192424	A	30-06-1997
			JP 9202796	A	05-08-1997
			US 5760072	A	02-06-1998
WO 9512414	A	11-05-1995	AU 1171795	A	23-05-1995

## INTERNATIONAL RESEARCH REPORT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07198

## A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K49/00 A61K47/48 A61K51/10 A61K49/04

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 87 04164 A (UNIV MELBOURNE) 16. Juli 1987 (1987-07-16) Seite 21, Zeile 8-24; Abbildung 10; Tabellen 1,2	1,2,4-6, 8,19-21
Y	LEE W S ET AL: "Thy - 1, a novel marker for angiogenesis upregulated by inflammatory cytokines 'see comments!' CIRCULATION RESEARCH, US, GRUNE AND STRATTON, BALTIMORE, Bd. 82, Nr. 8, 4. Mai 1998 (1998-05-04), Seiten 845-851, XP002119748 ISSN: 0009-7330 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1,2,4-6, 8,19-21

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindertätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindertätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

7. Juni 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

15/06/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentean 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Veronese, A

**C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,Y	WO 99 45951 A (LEE WEN SEN ;SHAW SHYH YU (CN); JAIN MUKESH K (US); HABER CAROL EF) 16. September 1999 (1999-09-16) Seite 19, Zeile 1-41; Ansprüche	1,2,4-6, 8,19-21
Y	WO 97 31655 A (CASORATI GIULIA ;CORTI ANGELO (IT); DELLABONA PAOLO (IT); PELAGI M) 4. September 1997 (1997-09-04) Beispiele 1.3,1.5,1.6,2,2.3 Seite 14, Zeile 4	1,2,4-6, 8,19-21
Y	AL-YAHYAE S A S ET AL: "CELL TARGETING OF A PORE-FORMING TOXIN, CYTA BETA-ENDOTOXIN FROM BACILLUS THURINGIENSIS SUBSPECIES ISRAELEMENSIS, BY CONJUGATING CYTA WITH ANTI-THY 1 MONOCLONAL ANTIBODIES AND INSULIN" BIOCONJUGATE CHEMISTRY,US,AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, Bd. 7, Nr. 4, 1. Juli 1996 (1996-07-01), Seiten 451-460, XP000637463 ISSN: 1043-1802 das ganze Dokument	1,2,4-6, 8,19-21
P,Y	WO 98 47541 A (COCKBAIN JULIAN R M ;KLAVENESS JO (NO); NAEVESTAD ANNE (NO); NYCOM) 29. Oktober 1998 (1998-10-29) das ganze Dokument	1,2,4-6, 8,19-21
P,Y	WO 99 40947 A (ESHIMA DENNIS ;POLLAK ALFRED (CA); THORNBAC JOHN (CA); FAUCONNIER) 19. August 1999 (1999-08-19) das ganze Dokument	1,2,4-6, 8,19-21
A	WO 97 33552 A (LI CHUN ;WALLACE SIDNEY (US); YU DONG FANG (US); WALLACE TECH INC) 18. September 1997 (1997-09-18) Seite 14, Zeile 21 -Seite 15, Zeile 11 Beispiel 1 Ansprüche 1,4-11 Abbildungen 1-5	1,2
A	WO 97 19938 A (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION ;AMAT GUERRI FRANCISCO (ES); SOUTO) 5. Juni 1997 (1997-06-05) das ganze Dokument	1,2
A	EP 0 781 778 A (PHARMACHEMIE BV) 2. Juli 1997 (1997-07-02) das ganze Dokument	1,2

-/-

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	NERI D ET AL: "Targeting by affinity-matured recombinant antibody fragments of an angiogenesis associated fibronectin isoform" NATURE BIOTECHNOLOGY,US,NATURE PUBLISHING, Bd. 15, Nr. 12, November 1997 (1997-11), Seiten 1271-1275, XP002124779 ISSN: 1087-0156 Seite 1271, Spalte 1 -Seite 1272, Spalte 1 -----	1,2,4,6, 8,19-21
A	ARAP W ET AL: "CANCER TREATMENT BY TARGETED DRUG DELIVERY TO TUMOR VASCULATURE IN A MOUSE MODEL" SCIENCE,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, Bd. 279, 16. Januar 1998 (1998-01-16), Seiten 377-380, XP000857470 ISSN: 0036-8075 Seite 378, Spalte 1 -Seite 379, Spalte 1 Abbildung 3 Seite 380, Spalte 1-2 -----	1,2,4,6, 8,19-21
A	WO 95 12414 A (REPLIGEN CORP) 11. Mai 1995 (1995-05-11) Seite 4, Zeile 28 -Seite 5, Zeile 5 Seite 6, Zeile 12-17 Seite 9, Zeile 11-14 Seite 15, Zeile 13 -Seite 16, Zeile 10 Seite 44, Zeile 30 Ansprüche; Beispiele 10,17,22,24,31,36 -----	1,2,4,6, 8,19-21

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99 07198

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1,2,4-8,12,19-21

Verwendung von Konjugaten aus Thy-1 Antikörpern und diagnostischen Wirkgruppen zur Diagnose von Tumoren, wobei die diagnostischen Wirkgruppen ausgewählt werden aus Iod-123, Jod-125, oder einem Komplex eines der folgenden Metalle: Indium-111, Y-90, Rhenium-186, Technetium-99.

2. Ansprüche: 1,2,4-8,12,19-21

Verwendung von Konjugaten aus Thy-1 Antikörpern und therapeutische Wirkgruppen zur Behandlung von Tumoren, wobei die therapeutischen Wirkgruppen ausgewählt werden aus Iod-123, Jod-125, oder einem Komplex einer der folgenden Metalle: Indium-111, Y-90, Rhenium-186, Technetium-99.

3. Ansprüche: 1,2,12,14,19-21

Verwendung von Konjugaten aus Erbstatin und Paclitaxel zur Behandlung von Tumoren



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99 07198

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 3,9-11,13,15-18,22

Die geltenden Patentansprüche 1-22 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen/Produkte. In der Tat umfassen sie so viele Wahlmöglichkeiten, und mögliche Permutationen, daß sie im Sinne von Art. 6 PCT in einem solchen Maße unklar und zu weitläufig gefaßt erscheinen, als daß sie eine sinnvolle Recherche ermöglichen. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, die als klar und knapp gefaßt gelten können, nämlich Verbindungen, die in den Ausführungsbeispielen angegeben sind (Th-1 Antikörpern - Radionuclide Konjugate) und (Erbstatin-Paclitaxel Konjugate).

Unten dem Einwand mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung sind nur die Gegenstände aufgeführt worden, die ausreichend in der Beschreibung offenbart und von den Beschreibung gestützt werden.

Unvollständig Rechercherte Ansprüche: 1,2, 4-8,12,14,19-21

Nicht Rechercherte Ansprüche: 3,9-11,13,15-18,22

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

# INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 99/07198

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 8704164 A	16-07-1987	AU 6843287 A EP 0252951 A	28-07-1987 20-01-1988
WO 9945951 A	16-09-1999	KEINE	
WO 9731655 A	04-09-1997	IT MI960358 A AU 1769497 A CA 2247308 A EP 0885015 A	27-08-1997 16-09-1997 04-09-1997 23-12-1998
WO 9847541 A	29-10-1998	AU 4718297 A AU 4786697 A AU 4786797 A AU 4787097 A AU 7068798 A BG 103438 A BG 103439 A BR 9712683 A CN 1238700 A CN 1234742 A CZ 9901494 A EP 0973552 A EP 0991427 A EP 0963209 A EP 0977600 A WO 9818500 A WO 9818501 A WO 9818495 A WO 9818498 A NO 991889 A NO 991890 A	22-05-1998 22-05-1998 22-05-1998 22-05-1998 13-11-1998 31-01-2000 31-01-2000 19-10-1999 15-12-1999 10-11-1999 15-09-1999 26-01-2000 12-04-2000 15-12-1999 09-02-2000 07-05-1998 07-05-1998 07-05-1998 07-05-1998 28-06-1999 28-06-1999
WO 9940947 A	19-08-1999	AU 2406699 A	30-08-1999
WO 9733552 A	18-09-1997	AU 2580697 A BR 9710646 A CA 2250295 A CN 1217662 A CZ 9802908 A EP 0932399 A NO 984210 A PL 328807 A US 5977163 A	01-10-1997 11-01-2000 18-09-1997 26-05-1999 14-07-1999 04-08-1999 11-11-1998 15-02-1999 02-11-1999
WO 9719938 A	05-06-1997	ES 2105983 A ES 2121549 A	16-10-1997 16-11-1998
EP 0781778 A	02-07-1997	CA 2192424 A JP 9202796 A US 5760072 A	30-06-1997 05-08-1997 02-06-1998
WO 9512414 A	11-05-1995	AU 1171795 A	23-05-1995